

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin - Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof.Dr.K.Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF,
Assoziation mit Euratom, München
(Leiter: Prof.Dr.W.Stich)

DIE WIRKUNG DER L-ASPARAGINASE AUF MENSCHLICHES
KNOCHENMARK IN VITRO.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der ehem.

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Reckers
aus Löningen

1971

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin - Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof.Dr.K.Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF,
Assoziation mit Euratom, München
(Leiter: Prof.Dr.W.Stich)

DIE WIRKUNG DER L-ASPARAGINASE AUF MENSCHLICHES
KNOCHENMARK IN VITRO.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der ehem.

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Reckers
aus Lönningen

Referent: Prof.Dr.med.I.B o l l

Korreferent: Prof.Dr.med.~~H. G o p e r~~

D. Neubert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Fromoviert am: 18. 1. 1971



Meinen Eltern gewidmet

Gliederung

1) Literaturüberblick

2) Methode

3) Ergebnisse

a) Morphologie

b) Reifungskurven

c) Mitoseindices

d) G/E Indices

4) Diskussion

5) Zusammenfassung

6) Literaturverzeichnis

L-Asparaginase, ein seit 1904 bekanntes Enzym, unterscheidet sich wegen seiner Ferment-Natur grundsätzlich von den bisher angewandten Zytostatika. Es soll speziell auf leukämische Zellen und nicht auf alle regenerierenden Gewebe des Organismus eine wachstumshemmende Wirkung ausüben. (21)

Die Kenntnis des zytostatischen Effektes geht zurück auf eine Beobachtung von Kidd, (24) der zum ersten Mal im Jahre 1953 die Antitumorwirkung von Meerschweinchenserum auf transplantierbare Mäuselymphome beschrieb. Erst acht Jahre später gelang Broome der Nachweis, daß im Meerschweinchenserum ein bestimmter tumorhemmender Wirkstoff enthalten ist, und daß es sich dabei um das Enzym L-Asparaginase handelt. Weitere zahlreiche Untersuchungen in den Vereinigten Staaten und in Deutschland bestätigen diese Wirkung des Enzyms, welches zunächst aus Meerschweinchenserum, später durch Mashburn und Wriston (3) aus E.coli gewonnen wurde.

Dolowy und Mitarbeiter (11) führten die L-Asparaginase mit gewissem Erfolg in die Leukämiebehandlung ein. Erweiterte klinische Prüfungen nahmen Hill (16) und Oettgen (17, 18, 19) vor. Bei der akuten Leukämie verabreichte Hill (16) Gesamtdosen von 3000 i.E./kg und erzielte Knochenmarkremissionen bei 11 von 21 Patienten.

Stier, Schmidt und Gallmeier (26) weisen auf ähnliche Ergebnisse, vorwiegend bei der akuten lymphatischen Leukämie, hin. Oettgen (19) berichtet, daß bei einer Dosis von 10-200 i.E./kg/die bei akuten lymphatischen Leukämien Knochenmarkremissionen bei 16 von 23 Patienten auftraten.

Begemann (5) trug Ergebnisse von 35 Kliniken zusammen, in denen 107 Patienten mit verschiedenen akuten Leukämien mit L-Asparaginase behandelt wurden. Bei 45 % sämtlicher lymphoblastischen und 60 % aller kindlichen lymphoblastischen Leukämien wurde eine Voll- oder Teilremission erzielt, außerdem bei 25 % der Promyelocytenleukämien.

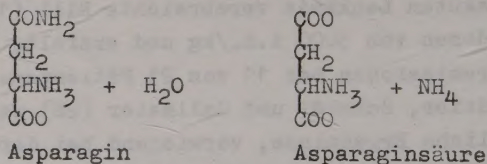
Außer im Meerschweinchen, welches nach Grundmann 300 E/ml L-Asparaginase im Serum enthält, sowie E.coli wurde eine wirksame L-Asparaginase im Serum von südamerikanischen Nagern, vor allem in Agoutis und Pacas, in Pilzen und Hefen (3) gefunden.

E.coli produziert zwei L-Asparinasen EC_1 und EC_2 . Campbell (17) nannte die tumorwirksame mit dem Aktivitätsoptimum bei p_H -6 und 8,4 EC_2 .

Über die Struktur des Enzyms und seinen Stoffwechsel im Organismus ist wenig bekannt.

L-Asparaginase ist eine L-Asparaginhydrolase, die den Abbau von Asparagin zu Asparaginsäure unter Freiwerden von Ammoniumionen katalysiert.

Hydrolyse von L-Asparagin in Gegenwart von L-Asparaginase (13)



Die Bildung von Asparagin erfolgt über das Enzym Asparaginsynthetase. Bei dieser Reaktion entsteht in Gegenwart von Glutamin, ATP und Mg-Ionen aus Asparaginsäure Asparagin.

Da L-Asparagin keine essentielle Aminosäure ist, kann der Organismus mit Hilfe der Asparaginsynthetase L-Asparagin selbst synthetisieren. Dies gilt jedoch nicht für die leukämische Zelle.(17) Sie ist darauf angewiesen, ihren Asparaginbedarf durch Entnahme von Aminosäuren aus dem Blut zu decken. Wird durch L-Asparaginase das L-Asparagin im Blut zu Asparaginsäure hydrolysiert, fehlt den Lymphomzellen die für sie essentielle Aminosäure und die Zellen gehen zugrunde. Die L-Asparaginase Therapie unterscheidet sich demnach grundsätzlich von der zytostatischen Therapie. Ihr Wirkungsmechanismus basiert auf der Ausnutzung eines Stoffwechseldefektes leukämischer Zellen. Da, nach Oettgen (17) das Enzym weder in die normale noch in die Tumorzelle eintritt, wird keine Zelle, die ihr eigenes Asparagin produziert, in ihrem Stoffwechsel außerhalb der Zellmembran durch L-Asparaginase beeinträchtigt. Asparagin, welches, wie oben berichtet, für normale Zellen nicht essentiell ist, stellt damit den ersten bekannten und therapeutisch nutzbaren Stoffwechseldefekt bestimmter Tumorzellen dar.

In vitro Tests sind von Nutzen, um festzustellen, welche Tumoren auf eine Enzymgabe ansprechen. Der dazu verwandte Prediction Test von Cline (10) für verschiedene Zytostatika angewandt, basiert nach Oettgen und Mitarbeiter (18) auf dem Nachweis der Hemmung des Einbaus der Aminosäure Valin (26) in Leukämiezellen durch L-Asparaginase.

Die Frage, warum nur gewisse Tumoren diesen Stoffwechseldefekt aufweisen, beantwortet uns Broome.(4) An Untersuchungen bei Mäusen fand er L-Asparaginase sensible und L-Asparaginase resistente Zellstämme.

Nach L-Asparaginase Verabreichung tritt bei beiden zunächst eine Senkung des L-Asparaginspiegels ein. Die resistenten Zellen haben 1. eine höhere Asparaginsynthese und 2. endogenes Asparagin, das sie für die Proteinsynthese ausnützen können. Die sensiblen Zellen bauen eine größere Menge exogenen Asparagins ein und verfügen über wenig oder keine L-Asparaginsynthetase.

Interessante histologische Untersuchungen machten Dolowy und Henson (11) am Walker Carcinosarkom, einem Misch tumor. Nach L-Asparaginase Behandlung beobachteten sie zunächst eine Kernschwellung, dann Kernpyknose der epithelialen (sensiblen) Zellen, während resistente Zellen intakt und damit teilungsfähig blieben.

Nach bisherigen klinischen Befunden (12,16,17,23,24) ist die L-Asparaginase beim Menschen vor allem wirksam bei der

- 1) akuten lymphoblastischen Leukämie,
- 2) Paramyeloblastenleukämie,
- 3) chronischen Myelose

Auch im Tierexperiment waren bei den lymphatischen Leukämien die besten Heilungstendenzen nachweisbar. (13)

Die L-Asparaginase ist zur Zeit keinesfalls ein harmloses antileukämisches Medikament. Die Nebenwirkungen bestehen fast stets in einer individuell unterschiedlich ausgeprägten Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens mit Reduktion der Nahrungsaufnahme, Nausea, Erbrechen und Abgeschlagenheit. (24)

Fieber und Schüttelfrost wurden bei der Injektion höherer Dosen (1000 i.E./kg) festgestellt. Oettgen und Mitarbeiter (19) fanden die letzten beiden Symptome auch bei den Patienten, deren Leukämie sich gegen L-Asparaginase resistent verhielt; folglich können derartige Reaktionen nicht auf den Zerfall von leukämischen Zellen zurückzuführen sein. Weitere charakteristische Begleitreaktionen dieser Therapie bestehen nach Stöckl, Stacher, Weiser und Höcker (27) in einer Störung der Proteinsynthese. Da L-Asparagin - NH_2 Bestandteil der meisten Eiweißkörper ist, beeinflusst der dauernde Entzug den Aminosäurestoffwechsel und damit die Proteinsynthese negativ. Dies führt häufig zur Hypalbuminurie und Hypcholesterinämie. Gallmeier, Schmidt und Stier (26) beobachteten weiterhin einen Aktivitätsabfall der plasmatischen Gerinnungsfaktoren, der infolge Asparaginentszugs zu einer Störung der Proteinsynthese in den Leberparenchymzellen (damit auch Leberschäden) und RES führt.

Eine Sensibilisierung auf L-Asparaginase wurde von Oettgen (18) sowie Schmidt und Gallmeier (23) beobachtet, weiter vereinzelt urtikarielle Reaktionen, Quincke-Ödeme mit Beteiligung des Pharynx und Larynx. Es ist zur Zeit noch ungeklärt, ob die Sensibilisierung sich gegen L-Asparaginase selbst richtet oder gegen Spuren bakterieller Nebenprodukte wie z.B. E.coli Endotoxine, die als sensibilisierendes Antigen wirken.

Fast alle bisher bekannten Zytostatika wirken mutagen, so führt auch der kurzfristige Asparaginentszug für normal wachsende Gewebe zu embryotoxischen Nebenwirkungen.

Adamson und Fabro (1) beobachteten Mißbildungen beim Kaninchen und Fetusresorptionen.

F r a g e s t e l l u n g

Da bisher nur Arbeiten über die Hemmung des Stoffwechsels leukämischer Zellen durch L-Asparaginase vorliegen, sollen diese Untersuchungen Aufschluß darüber geben, ob das Enzym auch die normale Hämatopoese beeinträchtigt, denn nach Grundmann (12) steht die Frage, in wie weit auch normale schnell proliferierende Gewebe durch L-Asparaginase behindert werden, noch offen. Die von Boll (7) eingeführte Beurteilung der Proliferationskinetik nach Differentialzählungen von Knochenmarkkoagulumkulturen, bot sich zur Beurteilung der L-Asparaginase an. Die hemmende Konzentration beträgt nach Oettgen und Schmidt (23) 10 E/ml.

Wir verwendeten

- 1) eine von Bayer aus E.coli hergestellte L-Asparaginase, die in Trockenampullen vorlag. ^{x)}
- 2) Um toxische Einwirkungen durch Nebenprodukte wie Glutaminase der aus E.coli nicht kristallin dargestellten L-Asparaginase auszuschließen, (nach einer Anregung von Oettgen) wurden drei weitere Versuche mit Meerschweinchen L-Asparaginase (0,1 und 1,0 %) durchgeführt.
- 3) Bei einer Patientin wurde außer L-Asparaginase nicht wie üblich Hank Lösung, sondern das auch für Knochenmarkkulturen geeignete Medium TC 199, welches eine ganze Reihe von Aminosäuren, u. a. DL-Glutaminsäure (150 mg/l) und DL-Asparaginsäure (60 mg/l) enthält, zum Gerinnselmedium zugegeben.

x) Die Substanz überließ uns freundlicherweise Prof. Dr. H. Gerhartz, Städt. Krankenhaus westend Berlin

M e t h o d e

Anhand von Reifungskurven der Kulturen von 24 bis 72 Stunden und Errechnung der Mitoseindizes wurden die Reifung und Regeneration bestimmt.

Die Kulturen von menschlichem Knochenmark werden nach der von Boll in Anlehnung an die Carrel'sche Technik entwickelten Methode der Gewebezüchtung auf dem hängenden Koagulum angelegt. Das Blutplasma des betreffenden Patienten wird mit Corrhormon und Hank'scher Lösung 40 % gemischt. Die Mischung muß 40 % Plasma enthalten, um zu gerinnen. Dreifach verstärktes Corrhormon ist in dem Medium zu 10 % (1 Tropfen) enthalten. Jeweils ein Tropfen von diesem Medium wird auf ein Deckglas gebracht und bildet ein Koagulum. Das durch Sternalpunktion gewonnene Knochenmark wird auf die Koagulum Tropfen gesetzt und mit Serum bedeckt. Die mit einem Hohlschliffobjektträger auf Paraffin luftdicht verschlossenen Kulturen werden bei 37° Celsius im Brutschrank inkubiert. Dann werden nach 24, 48 und 72 Stunden von den Kulturen jeweils zwei Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet und anschließend nach Pappenheim gefärbt.

Folgende Kulturen wurden angelegt:

- 1.) Kontrollkulturen ohne L-Asparaginase Zusatz
- 2.) Zusatzkulturen mit L- Asparaginase 10 E/ml wurde dem Koagulum und dem Serum beigegeben.
- 3.) Zusatzkulturen mit Meerschweinchenserum (0,1 und 1,0 %)
- 4.) Zusatzkulturen mit L-Asparaginase und 40 % TC 199 im Medium wurde dem Koagulum und dem Serum beigegeben.

Ausstriche der Kulturen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden angefertigt, außerdem jeweils ein Originalausstrich des Sternalpunktates. Von den technisch besten Ausstrichen wurden jeweils 1000 - 2000 Zellen gezählt.

Die rote Reihe wird differenziert in: (15)

Proerythroblasten,
basophile Erythroblasten,
polychromatische Erythroblasten,
oxyphile Erythroblasten,
reife Erythroblasten,
wobei die letzteren als nicht mehr teilungsfähig
angesehen werden.

Die weiße Reihe in :

Myeloblasten,
Promyelocyten,
neutrophile Myelocyten,
eosinophile Myelocyten,
basophile Myelocyten,
Metamyelocyten (jugendl.neutrophile Granulocyten)
neutrophile stabkernige Granulocyten,
neutrophile segmentkernige Granulocyten,
eosinophile segmentkernige Granulocyten,
basophile segmentkernige Granulocyten,
wobei Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten
(eos. und bas.) und Metamyelocyten zu den teilungs-
fähigen Granuloblasten gerechnet werden.

Die jüngste Zelle der Erythropoese ist der
Proerythroblast (15 - 20 μ Durchmesser). Sein
runder Kern hat eine dichte Chromatinstruktur.
Er ist gleichmäßig intensiv von einem dunkel-
basophilem Zytoplasmasaum umgeben. Fast immer
zeigt er feinste Zytoplasmaausstülpungen, "Öhrchen"
genannt, woran man ihn besonders gut erkennen
kann.

Der basophile Erythroblast, oder Normoblast, dessen Durchmesser im Vergleich zum Proerythroblasten stark vermindert ist (8 - 15 μ Durchmesser) hat einen runden Kern mit einer grobscholligen Kernstruktur. Das Zytoplasma zeigt mittelstarke Basophilie.

Kernstruktur und Zellgestalt des polychromatischen Erythroblasten ähneln stark dem des basophilen Erythroblasten. (8 - 12 μ Durchmesser). Die Farbe des Zytoplasmas nimmt durch Einlagerung von Hämoglobin eine Mischung von rötlichen und blauen Farbtönen an.

Der orthochromatische oder oxyphile Erythroblast (7 - 10 μ Durchmesser) besitzt ein grau-gelbes Zytoplasma. Die Kerngröße wird fortlaufend reduziert, weiterhin kommt es zu einer Pyknose des Kernchromatins.

Der reife Erythroblast (7 - 10 μ Durchmesser) besitzt einen dunkel-violett gefärbten Kern, wobei jegliche Kernstruktur fehlt. Das Zytoplasma ist hellgelb-grau. Sämtliche Zellen der roten Reihe, die einen total pyknotischen Kern besitzen, also nicht mehr teilungsfähig sind, werden zu den reifen Erythroblasten gerechnet, unabhängig von der Färbung des Zytoplasmas.

Der Myeloblast ist die Stammzelle und damit jüngste Zelle der Granulopoese. Der Durchmesser (10 - 12 μ) ist geringer als der des Proerythroblasten. Der häufig an einer Seite leicht eingebuchtete ovale Kern zeigt eine dichte und feinmaschige Chromatinstruktur. Das Zytoplasma ist schwach basophil. Häufig zeigt er deutlich sichtbare Nukleolen.

Der Promyelocyt (12 - 16 μ Durchmesser), die größte Zelle im Knochenmark, fällt sofort ins Auge durch seine azurophilen Granulationen. Der leicht bohnenförmige Kern besitzt ein Chromatin von mittlerer Dichte. Der Kern nimmt nahezu ein Drittel der Zelle ein. Die Größenzunahme des Promyelocyten erfolgt hauptsächlich zu Gunsten des Zytoplasmas, das im Vergleich zum Myeloblasten mehr mittel- hellblau aussieht.

Der neutrophile Myelocyt (10 - 14 μ Durchmesser) zeigt keine azurophilen Granula mehr und eine Verringerung des Zelldurchmessers und der Kerngröße. Der Kern zeigt eine dichte Chromatinstruktur. Das Zytoplasma ist mehr grau-braun oder rosa-braun, nicht mehr basophil.

Der eosinophile und basophile Myelocyt besitzen statt der neutrophilen Granula eosinophile und basophile, die nahezu die ganze Zelle bedecken.

Der Metamyelocyt (Jugendlicher) ist dem Myelocyten sehr ähnlich, hat jedoch einen viel stärker eingebuchteten Kern mit scholliger Struktur.

Der stabkernige Granulocyt fällt durch seinen hufeisenförmigen Kern auf. Er kann Einziehungen oder Einschnürungen besitzen, wobei die Verbindungen jedoch noch breiter als ein Drittel des Kernes sind. Die Chromatinschollen sind im Verhältnis zum Metamyelocyten vergrößert.

Der neutrophile segmentkernige Granulocyt (ca 10 μ Durchmesser) ist gekennzeichnet durch mehrere segmentale Kernabschnürungen. Meistens findet man 3-4 Segmente.

Beim eosinophilen bzw. basophilen segmentkernigen Granulocyten finden wir im allgemeinen nur zwei rundlich ovale Segmente, die von eosinophilen bzw. basophilen Granula bedeckt sind.

Weitere Zellen, die im Knochenmarkausstrich gefunden werden, sind:

Die großen und kleinen Reticulumzellen, Megakaryoblasten und Megakaryocyten, Monoblasten, Monocyten, Lymphoblasten und Lymphocyten.

Die Reticulumzellen haben eine lockere, feinfädige Kernstruktur mit Vakuolen. Das Zytoplasma ist sehr dünn und wegen seiner großen Dimensionen oft nicht ganz im Ausstrichpräparat sichtbar. Ab und zu findet man intraplasmatische Einlagerungen von phagozytierter Substanz, man bezeichnet sie dann als phagozytierende Reticulumzellen.

Die Plasmazellen mit ihren besonders charakteristischen Zelleigenschaften zeigen viel Zytoplasma mit ein oder zwei exzentrisch gelegenen kleinen, runden Kernen. Das Zytoplasma ist kornblumenblau und zeigt fast immer Vakuolen von unterschiedlicher Größe und Form. Die Kern-Plasma-Relation ist 1:5.

Der Megakaryoblast und der Megakaryocyt gehören zu den Riesenzellen des Knochenmarks. Der erstere zeigt ein tief basophiles, relativ schmales Zytoplasma. Der Megakaryocyt hat im Verhältnis zur Zellgröße einen kleinen Kern. Man erkennt ihn durch seine plumpe und gelappte Form. Das Zytoplasma ist vielfarbig, zeigt teils eine polychromatisch-oxyphile Grundfarbe und Felderung, aber auch oft eine zart basophile Tönung.

Der Monoblast (Promonocyt) ist die noch teilungsfähige Vorstufe des Monocyten. Der Kern zeigt eine lockere Chromatinstruktur. Sein hell-basophiles Zytoplasma besitzt sehr feine Granulationen.

Der Monocyt ist gekennzeichnet durch einen großen lockeren, häufig ungleichmäßig gebuchteten Kern. Das schiefergrau-blaue Zytoplasma zeigt azurophile Granulation.

Die Lymphocyten zeigen eine rund-ovale Zellform. Das meist schmale, halbmondförmige Zytoplasma, als Häubchen bezeichnet, hat eine mittel-hell basophile Farbe. Der runde oder gebuchtete Kern besitzt eine kompakte Chromatinstruktur und ist dunkel-violett gefärbt.

Neben der Differenzierung der einzelnen Zellformen werden in der Zellzählung auch die verschiedenen Mitosephasen erfaßt.

Wir unterscheiden sechs Phasen:

1.) Prophase

Die Chromatinteile des Kernes zerfallen in einzelne Chromosomen. Nukleoli und Kernmembran sind nicht mehr vorhanden.

Festes Spirem.

2.) Frühe Metaphase

Die Chromosomen sind über die ganze Zelle verteilt. Lockeres Spirem.

3.) Späte Metaphase

Die Chromosomen ordnen sich in der Mitte der Kernspindel in einer Ebene, der Äquatorialplatte, Metaster oder Mutterstern genannt, danach teilt sich jedes Chromosom in zwei Hälften.

4.) Anaphase

Jeweils die Hälfte der Chromosomen rücken nach den entgegengesetzten Polen der Kernspindel auseinander. Wir beobachten jetzt zwei Spindelplatten in der runden oder ovalen Zelle. Diaster oder Tochterstern.

5.) Telophase

Einschnürung des Zellplasmas. Die Chromosomen bilden noch ein lockeres Dispirem.

6.) Rekonstruktionsphase

Festes Dispirem vor Ausbildung der Kerne mit Kernmembran in den beiden Tochterzellen.

Nach den Differentialzählungen wurden die ermittelten Zahlen graphisch in Reifungskurven dargestellt, weiterhin Tabellen der Mitoseindices getrennt für die Erythropoese und Granulopoese angefertigt und das Verhältnis beider zueinander im G/E Index ermittelt.

Die Mitoseindices werden in Promille angegeben, sie bezeichnen das Verhältnis der Mitosen auf 1000 teilungsfähige Zellen. Die Reifungskurven geben die prozentuale Verteilung der Zellformen wieder, während der G/E Index das relative Verhalten der Granulopoese zur Erythropoese zeigt.

E r g e b n i s s e

Das Knochenmark wurde von acht Patienten gewonnen:

Patientin: Sch.V.

Einweisung: 24. 10. 68

Diagnose: Plasmocytom

Knochenmarkdiagnose: sehr unreifes Plasmocytom

Therapie bis zur Sternalpunktion: 4. 11. 68

tgl. 1 Drg. Cedilanid^R

45 mg Ultracorten^R

3 x 30 Tropfen Polybion^R

1 g Cebion^R

5 mg Progynon^R i. m.

100 mg Primobolan^R

Blutbild: 28. 10. 68

Erythrocyten	2,56 Mill./mm ³
--------------	----------------------------

Hb	10,0 g %
----	----------

Hb _E	39,9 g %
-----------------	----------

Leukocyten	1400/mm ³
------------	----------------------

Stab	18 %
------	------

Seg	49 %
-----	------

Lymph	24 %
-------	------

Monos	1 %
-------	-----

AMZ	8 %
-----	-----

Thrombocyten	29000/mm ³
--------------	-----------------------

Patient: Sch.E.

Einweisung: 4. 11. 68

Diagnose: nephrogene Anämie

Knochenmarkdiagnose: etwas angeregte Erythropoese
und angeregtes Reticulum,
Infekt oder Tumoranämie.

Therapie bis zur Sternalpunktion: 12.11. 68

10 mg Valium^R

Pyramidon^R

4 ml Cordalin^R

0,5 mg Lanicor^R

1 g Reverin^R

Blutbild: 5. 11. 68

Erythrocyten	2,92 Mill./mm ³
Hb	8,5 g %
Hb _E	29,1 %

Leukocyten	12400/mm ³
Stab	10 %
Seg	87 %
Lymph	2 %
Monos	1 %

Patientin: M.I.

Einweisung: 17. 10. 68

Diagnose: Eisenmangelanämie

Knochenmarkdiagnose: gesteigerte Erythropoese und
 linksverschobene Myelopoese,
 verminderte Eisenspeicherung.

Therapie bis zur Sternalpunktion: 22. 10. 68

20 Tropfen Novalgin^R

tgl. 25 ml Distraneurin^R

Blutbild: 18. 10. 68

Erythrocyten	2,56 Mill./mm ³
Hb	8,5 g %
Hb _E	33,2. ♂♂
Leukocyten	13300/mm ³
Meta	1 %
Stab	24 %
Seg	61 %
Lymph	9 %
AMZ	5 %
Thrombocyten	196000/mm ³

Patientin: S.E.

Einweisung: 7. 10. 68

Diagnose: orthostatische Dysregulation, Anämie
und Eosinophilie.

Knochenmarkdiagnose: normochrome Anämie, Eosinophilie

Therapie bis zur Sternalpunktion: 10. 10. 68

Lamuran^R

Ferro-Folgamma^R

Blutbild: 8. 10. 68

Erythrocyten	3,34 Mill./mm ³
Hb	9,8 g %
Hb _E	29,3 JJ
Leukocyten	7600/mm ³
Bas	1 %
Eos	14 %
Meta	1 %
Stab	3 %
Seg	57 %
Lymph	12 %
Monos	6 %
AMZ	6 %
Thrombocyten	173000/mm ³

Patient: v.S.H.

Einweisung: 28. 8. 68

Diagnose: hämolyt. Anämie durch inkomplette Wärme-
agglutinine, Lebercirrhose

Knochenmarkdiagnose: stark vermehrte und linksver-
schobene Erythropoese. Der Be-
fund spricht im Zusammenhang
mit der Klinik für hämolyt.
Anämie (mit Sideroachresie)

Therapie bis zur Sternalpunktion: 9. 10. 68

Lanicor^R

Zyloric^R

Beromycin^R

Hexobion^R

Blutbild: 29. 8. 68

Erythrocyten	1,72 Mill./mm ³
Hb	5,4 g %
Hb _E	47,0 %
Leukocyten	7100 /mm ³
Eos	3 %
Prom	1 %
Meta	1 %
Stab	6 %
Seg	51 %
Lymph	34 %
Monos	4 %
Thrombocyten	160000/mm ³

Patientin: E.L.

Einweisung: 24. 1. 69

Diagnose: Leberparenchymschaden, Diabetes
mellitus, Paroxysmale absolute
Tachyarrhythmie.

Knochenmarkdiagnose: Relative Lymphocytose,
Monocyten vermehrt

Therapie bis zur Sternalpunktion: 3. 2. 69

1,0 g Redul^R
Digitalis

Blutbild: 25. 1. 69

Erythrocyten	3,66 Mill./mm ³
Hb	12,6 g %
Hb _E	34,2 %
Leukocyten	4100/mm ³
Seg	50 %
Lymph	48 %
Monos	2 %

Patient: Zu. S.

Einweisung: 14. 2. 69

Diagnose: Lymphosarkomatose

Knochenmarkdiagnose: normaler Knochenmarkbefund

Therapie bis zur Sternalpunktion: 14. 2. 69

Phanodorm^R

Lanicor^R

Ronicol retard^R

Blutbild: 9. 6. 69

Erythrocyten	3,52 Mill./mm ³
--------------	----------------------------

Hb	10,6 g %
----	----------

Hb _E	30,0 %
-----------------	--------

Leukocyten	3500/mm ³
------------	----------------------

Bas	1 %
-----	-----

Eos	9 %
-----	-----

Meta	1 %
------	-----

Stab	4 %
------	-----

Seg	58 %
-----	------

Lymph	19 %
-------	------

Monos	5 %
-------	-----

AMZ	3 %
-----	-----

Thrombocyten	10900/mm ³
--------------	-----------------------

Patient: B.W.

Einweisung: 14. 2. 69

Diagnose: Eisenmangelanämie

Knochenmarkdiagnose: Tumorverdacht bei hoher
Senkung, Eisenmangel

Therapie bis zur Sternalpunktion: 19. 2. 69

Ferrlecit^R

Blutbild: 15. 2. 69

Erythrocyten	4,66 Mill./mm ³
Hb	13 g %
Hb _E	28,0 <i>ff</i>
Leukocyten	9700/mm ³
Bas	1 %
Eos	1 %
Seg	57 %
Lymph	29 %
Monos	12 %
Thrombocyten	191000/mm ³

Ergebnisse der Reifungskurven, Mitoseindices
und G/E Indices

Aus den Knochenmarkkulturen wurden insgesamt 83000 Zellen differenziert. Von den Ausstrichen der Patienten Sch.E., S.E. und Sch.V. wurden jeweils 2000 Zellen ausgezählt, von den anderen Patienten 1000 Zellen.

Bei der zeichnerischen Darstellung wurden folgende Abkürzungen verwendet. Für die

G r a n u l o p o e s e

- Prom - Promyelocyten
- Myel - neutrophile Myelocyten
- eos - eosinophile Myelocyten
- MM - neutrophile jugendliche
Granulocyten (Metamyelocyten)
- St - neutrophile stabkernige
Granulocyten
- Seg - neutrophile segmentkernige
Granulocyten
- Moc - Monocyten

E r y t h r o p o e s e

- PE - Proerythroblasten
- bE - basophile Erythroblasten
- pE - polychromatische Erythroblasten
- oE - oxyphile Erythroblasten
- rE - reife Erythroblasten

Ferner gelten folgende Kennzeichen

- Kontrollkulturen
- - - - - Zusatzkulturen mit
L-Asparaginase
- .-.-.-. Zusatzkulturen mit L-Asparagi-
nase und TC 199

ABB. 1

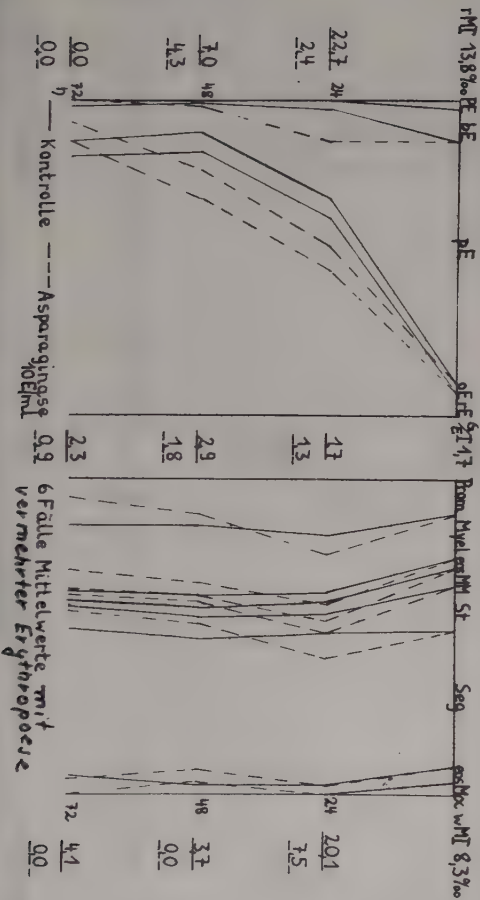


ABB. 2

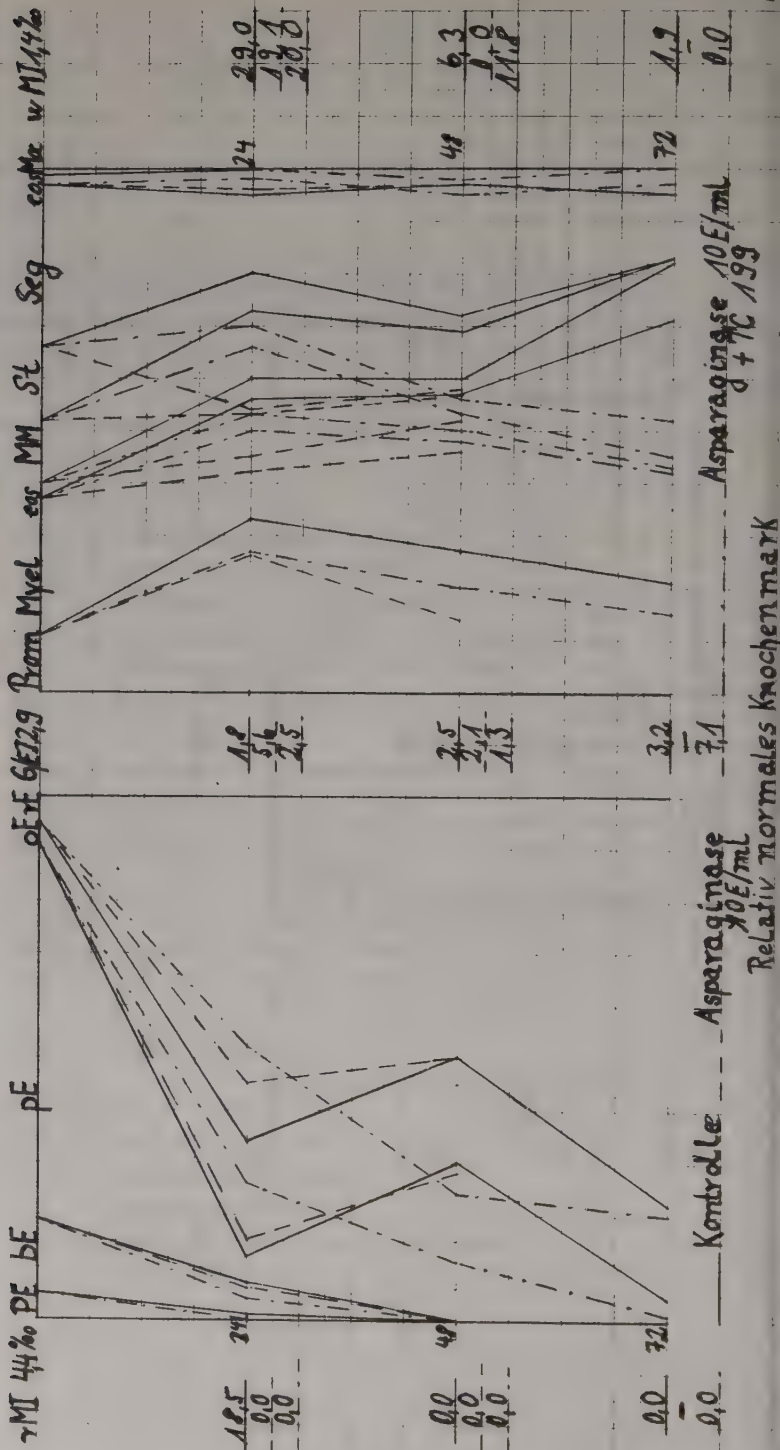
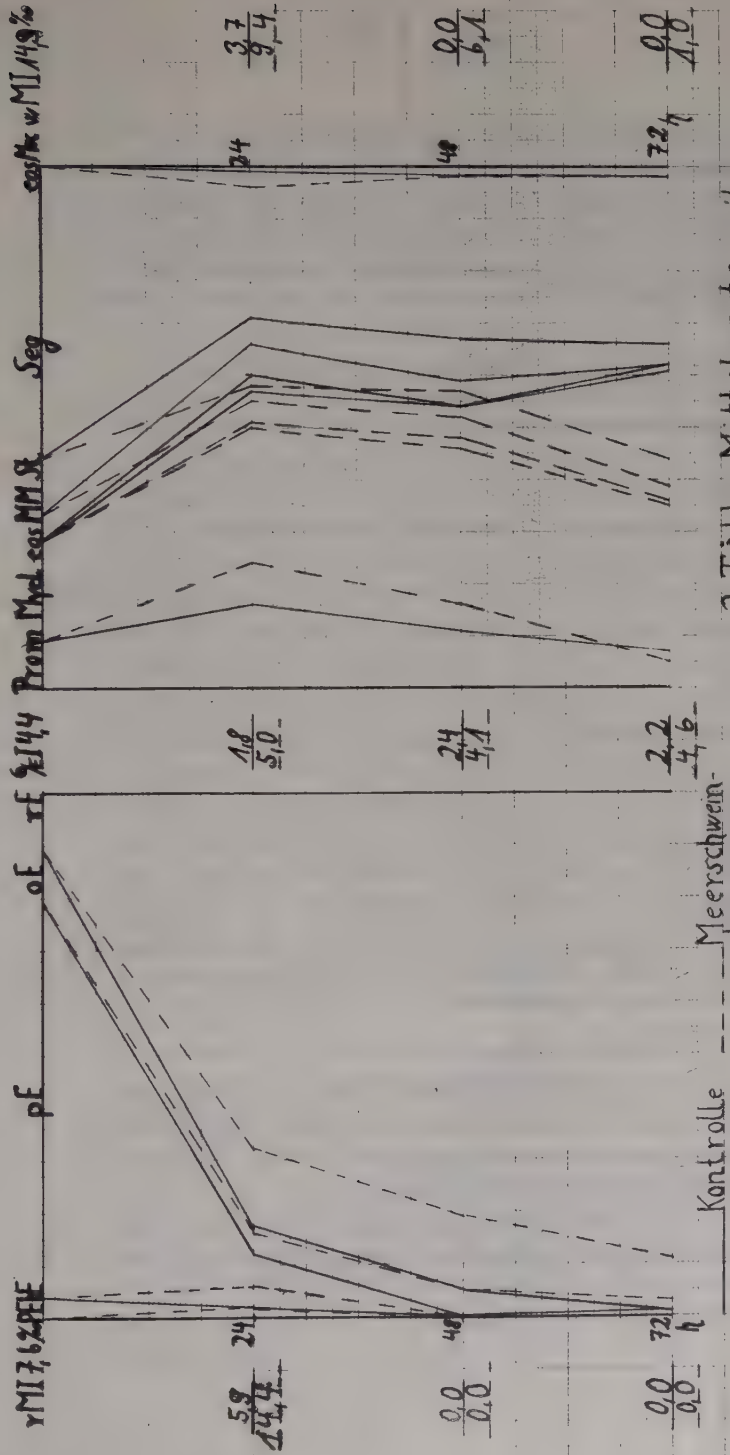


ABB 3



2 Fälle Mittelwerte mit vermehrter Granulopoese

Die Ergebnisse der Differentialzählungen der Patienten Sch.E., E.L., M.I., Sch.E., v.S.H. und S.E. wurden graphisch in einer Reifungskurve zusammengestellt und zeigen in der G r a - n u l o p o e s e von 24 - 72 Stunden folgendes: (Abb. 1)

Gegenüber dem Originalausstrich finden sich bei den Kontrollkulturen nach 24 Stunden eine Vermehrung der Promyelocyten und Myelocyten sowie eine geringe Vermehrung der neutrophilen Granulocyten. Beim Zusatz von L-Asparaginase sehen wir eine weitere Vermehrung der Promyelocyten und Abnahme der neutrophilen Granulocyten. Die Vermehrung der teilungsfähigen Zellen finden sich jedoch nur bei den Kulturen der Patienten M.I. und Sch.V. (Tab. A) Alle übrigen Versuchsreihen zeigen beim L-Asparaginase Zusatz eine signifikante Abnahme der Promyelocyten. Nach 48 Stunden sehen wir beim Zusatz des Enzyms nahezu die gleichen Werte wie in den Kontrollen, mit Ausnahme einer signifikanten Verminderung der Promyelocyten, so daß die Ausgangswerte wieder erreicht sind. Bei der Kulturzeit von 72 Stunden läßt sich eine weitere Abnahme der teilungsfähigen Zellen feststellen. Diese Veränderungen verursachen am stärksten die Signifikanz des χ^2 Wertes.

Die Reifungskurve der Granulopoese der Patientin E.L. (Abb. 2) zeigt in den Kontrollen nach 24 Stunden gegenüber dem Originalausstrich die übliche Vermehrung der teilungsfähigen Zellen. Beim Zusatz von 10 E/ml L-Asparaginase sind sowohl nach 24 als auch 48 Stunden die Promyelocyten und

Myelocyten vermindert und die Segmentkernigen vermehrt. Durch den Zusatz von L-Asparaginase und Medium TC 199 finden wir nach 24 Stunden im Gegensatz zur L-Asparaginase allein eine Verminderung der neutrophilen Granulocyten, nach 48 Stunden eine Vermehrung der Promyelocyten und Myelocyten bei gleichzeitigem Anstieg des Mitoseindex.

Die Reifungskurve Abb. 3 zeigt in der Granulopoese nach 24 Stunden in den Kontrollkulturen gegenüber dem Originalausstrich wieder eine Vermehrung der teilungsfähigen und Abnahme der reifen Zellelemente. Bei Zusatz von Meerschweinchenserum finden wir von 24 - 72 Stunden eine Vermehrung der Promyelocyten, Verminderung der Myelocyten und stabkernigen Granulocyten und Vermehrung der Segmentkernigen.

Der Mitoseindex der Granulopoese zeigt in den Kontrollen bei der Summenkurve Abb. 1 und Abb. 2 (Tab. B) nach 24 Stunden gegenüber dem Originalausstrich einen Anstieg, um nach 48 Stunden wieder abzufallen. Der Zusatz von L-Asparaginase bewirkt eine Verringerung des Mitoseindex gegenüber den Kontrollkulturen. Da trotz des erniedrigten Mitoseindex keine Signifikanz nach dem t-Test festzustellen war, wurden die Berechnungen nicht angeführt.

Beim Zusatz von L-Asparaginase und Medium TC 199 beobachten wir besonders nach 48 Stunden einen Anstieg des Mitoseindex gegenüber dem Zusatz mit L-Asparaginase allein.

Abb. 3 zeigt in der 24 Stunden Kontrollkultur gegenüber dem Sofortausstrich einen wesentlich niedrigeren Mitoseindex, der nach 48 und 72 Stunden auf Null abfällt. Bei Zusatz von Meerschweinchenserum fällt der Mitoseindex nach 24 Stunden weniger ab.

E r y t h r o p o e s e

Bei einer Inkubationszeit von drei Tagen zeigt die Summenkurve Abb.1 im Mittel eine vermehrte Erythropoese. Schon im Originalausstrich findet sich bei den Kontrollkulturen eine relativ gleichmäßige Verminderung um etwa ein Drittel der Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten, bei Verdoppelung der oxyphilen Erythroblasten und besonders starker Vermehrung der reifen Erythroblasten. Nach 48 und 72 Stunden haben diese Veränderungen wie die Vermehrung der reifen Erythroblasten weiter zugenommen.

Bei der Zusatzkonzentration von 10 E/ml L-Asparaginase sehen wir sowohl nach 24 als auch 48 Stunden eine relative Verminderung der reifen Erythroblasten (Linksverschiebung), was auf eine Beeinträchtigung der Ausreifung oder Verstärkung der Entkernung schließen läßt. Der erniedrigte G/E Index spricht für das Erste. Diese Veränderungen der Versuchskulturen gegenüber den Kontrollen nach 24 und 48 Stunden beeinflussen den χ^2 Wert am stärksten und finden sich bei sämtlichen Patienten mit Ausnahme Sch.V. .

Die Veränderungen in den Zusatzkulturen nach 72 Stunden zeigen uns eine signifikante Abnahme der reifen Erythroblasten bei der Versuchsreihe des Patienten v.S.H. mit hämolytischer Anämie.

Die Reifungskurve der Patientin E.L. (Abb. 2) mit fast normalem Knochenmark, (G/E Index 2,8) zeigt bis 72 Stunden in vitro, daß die Erythropoese auch hier nach 24 Stunden wieder schnell ausreift und viele reife Erythroblasten gefunden werden.

Im Vergleich mit den Mittelwerten (Abb.1) ist die Reifung durch 10 E/ml L-Asparaginase sowohl nach 24 als auch 48 Stunden nicht so deutlich behindert.

Durch den Zusatz von 10 E/ml L-Asparaginase und Medium TC 199 wird die Reifung nach 48 Stunden etwas beschleunigt. (Abb.2)

Abb. 3 zeigt Mittelwerte der Kulturen B. W. und Z. S. (G/E Index 4,4), angesetzt mit Meerschweinchenserum (0,1 und 1,0 %). Sie bringen für die Erythropoese ähnliche Ergebnisse wie die Mittelwerte der Abb. 1. Auch hier stellt sich beim Zusatz von L-Asparaginase eine deutliche Verminderung der reifen Zellelemente nach 24 und 48 Stunden heraus, wobei jedoch nach 24 Stunden die Mitoseindizes erhöht sind.

Gehen wir nun näher auf die errechneten Mitoseindizes ein, so liegen in der Erythropoese die Werte der Zusatzkonzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden unter denen der Kontrollwerte.

Während bei der Summenkurve Abb. 1 und Abb. 3 (Tab. B) durch den Zusatz nach 24 Stunden noch einige Mitosen zu finden sind, kommen bei dem anderen Versuch keine mehr vor. Abb. 2 (Tab. B).

Bei Zusammenfassung aller untersuchten Mitosen in der Erythropoese läßt sich mit Hilfe des t-Testes bei L-Asparaginase Zusatz nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme der Mitoseindizes feststellen.

Signifikanzberechnung nach dem χ^2 Verfahren
von Helmut Pearson. (28)

Für die weiße Reihe mit 8 differenzierten Zell-
 formen war die Signifikanz bei einer Irrtums-
 wahrscheinlichkeit von 1 % bei $\chi^2 = 26,1$ gegeben;
 in der roten Reihe mit 5 Zellformen bei $\chi^2 = 20,5$.
 Dabei sind:

a = Zellzahl in den Zusatzkulturen
 b = Zellzahl in den Kontrollkulturen

$$m = \frac{a+b}{2}$$

$$\Delta = (a-m)$$

Die Signifikanzberechnung wurde nur für die mit
 10 E/ml L-Asparaginase behandelten Kulturen durch-
 geführt. Dazu gehören: E.L., Sch.E., M.I., Sch.V.,
 v.S.H. und S.E.

Bei den Kulturen, die keine Signifikanz nach dem
 χ^2 - Test zeigten, wurden die Berechnungen nicht
 angeführt.

Tabelle A

Patientin E.L. Granulopoese
 10 E/ml L-Asparaginase nach 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	$\frac{\Delta^2}{m}$
Mb	0	1	0,5	0,5	0,50
Prom	185	186	185,5	0,5	0,00
Myel	117	128	122,5	5,5	0,24
eos	26	25	25,5	0,5	0,00
MM	55	75	65	10	1,53
St	12	39	25,5	13,5	7,14
Seg	304	86	195	109	60,92
eos Seg	28	31	29,5	1,5	0,07
					70,40

Patientin E.L.

Granulopoese

10 E/ml L-Asparaginase nach 48 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	0	2	1	1	1,00
Prom	91	190	140,5	49,5	10,32
Myel	203	208	205,5	2,5	0,03
eos	39	20	29,5	9,5	3,02
MM	29	61	45	16	5,68
St	11	22	16,5	5,5	1,83
Seg	249	172	210,5	38,5	7,04
eos Seg	17	26	21,5	4,5	0,94
					29,86

Patient Sch.E.

Granulopoese

10 E/ml L-Asparaginase nach 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	0	2	1	1	1,00
Prom	50	120	85	35	14,41
Myel	195	280	237,5	42,5	6,70
eos	8	25	16,5	8,5	4,37
MM	61	60	60,5	0,5	0,00
St	140	150	145	5	0,17
Seg	508	540	524	16	0,48
eos Seg	5	26	15,5	10,5	7,11
					34,24

Patient Sch.E. Granulopoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 48 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	3	0	1,5	1,5	1,50
Prom	20	30	25	5	1,00
Myel	115	155	135	20	2,96
eos	3	15	9	6	4,00
MM	10	18	14	4	1,14
St	58	51	54,1	3,5	0,22
Seg	497	478	487,5	9,5	0,18
eos Seg	2	36	19	17	15,21
					<u>26,21</u>

Patientin M.I. Granulopoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	0	2	1-	1	1,00
Prom	537	191	364	173	84,94
Myel	34	76	21	13	8,04
eos	0	7	3,5	3,5	3,50
MM	7	17	12	5	2,08
St	20	43	31,5	11,5	4,19
Seg	111	215	163	52	16,58
eos Seg	10	7	8,5	1,5	0,26
					<u>120,59</u>

Patientin M.I. Granulopoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 48 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	1	0	0,5	0,5	0,50
Prom	107	136	121,5	14,5	1,73
Myel	41	44	42,5	1,5	0,05
eos	0	12	6	6	6,00
MM	7	10	8,5	1,5	0,26
St	25	42	33,5	8,5	21,56
Seg	144	354	249	105	44,27
eos Seg	13	21	17	4	0,94
					75,31

Patientin Sch.V. Granulopoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	1	3	2	1	1,00
Prom	19	2	10,5	8,5	6,88
Myel	10	9	9,5	0,5	0,26
eos	1	1	1,5	0,5	0,16
MM	4	1	2,5	1,5	0,90
St	7	2	4,5	2,5	1,38
Seg	41	86	63,5	22,5	7,97
eos Seg	1	0	0,5	0,5	0,50
					19,05

Patientin Sch.V.

Granulopoese

10 E/ml L-Asparaginase nach 48 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	0	1	0,5	0,5	0,5
Prom	10	65	32,5	22,5	15,57
Myel	30	88	59	29	29,00
eos	4	15	9,5	5,5	3,18
MM	4	10	7	3	1,28
St	17	30	23,5	6,5	1,79
Seg	54	165	109,5	68,5	42,85
eos Seg	2	2	2	0	0,00
					<u>94,17</u>

Patient v.S.H.

Granulopoese

10 E/ml L-Asparaginase nach 48 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	3	0	1,5	1,5	1,5
Prom	25	76	50,5	25,5	12,87
Myel	43	62	52,5	9,5	1,71
eos	10	9	9,5	0,5	0,02
MM	11	21	16	5	1,56
St	15	13	14	1	0,07
Seg	63	121	92	29	9,14
eos Seg	7	15	11	4	1,45
					<u>28,32</u>

Patient v.S.H. Granulopoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 72 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
Mb	0	1	0,5	0,5	0,50
Prom	43	92	67,5	24,5	13,77
Myel	52	35	43,5	8,5	1,65
eos	4	6	5	1	0,20
MM	24	6	15	9	5,40
St	13	14	13,5	0,5	0,01
Seg	91	157	124	33	8,78
eos Seg	4	15	9,5	5,5	3,18
					<u>33,49</u>

Patientin E.L. Erythropoese
10 E/ml L-Asparaginase 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	1	4	2,5	1,5	0,90
bE	7	19	13	6	2,76
pE	15	16	15,5	0,5	0,01
oE	37	69	53	16	4,83
rE	70	206	138	68	33,50
					<u>42,00</u>

Patient Sch.E. Erythropoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	4	7	5,5	1,5	1,50
bE	8	12	10	2	0,40
pE	686	32	359	327	29,77
oE	161	9	85	76	67,83
rE	305	600	452,5	120,5	32,08
					<u>131,58</u>

Patientin M.I. Erythropoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	6.	9	7,5	1,5	0,30
bE	43	20	31,5	11,5	4,19
pE	670	104	387	283	206,93
oE	35	45	40	5	0,62
rE	41	164	102,5	61,5	36,89
					<u>248,93</u>

Patientin M.I.

Erythropoesis

10 E/ml L-Asparaginase nach 48 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	3	17	10	7	4,90
bE	27	27	27	0	0,00
pE	237	16	146,5	90,5	55,90
oE	146	15	80,5	65,5	53,29
rE	170	266	218	48	10,56
					<u>124,65</u>

Patientin Sch.V.

Erythropoesis

10 E/ml L-Asparaginase nach 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	0	1	0,5	0,5	0,50
bE	40	1	20,5	19,5	18,54
pE	335	42	188,5	156,5	129,93
oE	1	1	1	0	0,00
rE	155	13	84	71	60,01
					<u>208,98</u>

Patient Sch.V. Erythropoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 48 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	2	0	1	1	1,00
bE	38	0	19	19	19,00
pE	140	22	81	59	42,97
oE	0	1	0,5	0,5	0,50
rE	247	105	176	71	28,64
					<u>75,11</u>

Patient v.S.H. Erythropoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 24 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	9	14	11,5	2,5	0,54
bE	35	2	18,5	16,5	14,71
pE	398	267	332,5	65,5	12,90
oE	129	79	104	25	6,00
rE	149	229	189	50	13,22
					<u>47,37</u>

Patientiv.S.H. Erythropoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 48 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	$\frac{\Delta^2}{m}$
PE	1	5	3	2	1,33
bE	4	2	3	1	0,33
pE	180	15	97,5	84,5	73,23
oE	168	97	132,5	35,5	9,51
rE	419	545	482	63	8,23
					<u>92,63</u>

Patient v.S.H. Erythropoese
10 E/ml L-Asparaginase nach 72 Stunden

Zelltyp	a	b	m	Δ	$\frac{\Delta^2}{m}$
PE	0	1	0,5	0,5	0,50
bE	0	1	0,5	0,5	0,50
pE	26	2	14	12	10,28
oE	170	56	113	57	28,75
rE	505	713	609	104	17,76
					<u>57,79</u>

Tabelle B

Mitoseindices (in Promille) der

G r a n u l o p o e s e

Einzelwerte der Summenkurve Abb. 1

Original-	Kontrolle			10 E/ml L-Asparaginase		
ausstrich	24Std	48Std	72Std	24Std	48Std	72Std
S.E.	10,0	11,5	3,1	0,0	0,0	0,0
Sch.V.	0,0	38,5	2,8	9,6	0,0	0,0
M.I.	9,8	0,0	4,9	-	10,4	0,0
Sch.E.	22,2	8,3	5,1	10,6	13,0	0,0
E.L.	1,4	29,0	6,3	1,9	8,1	0,0
v.S.H.	6,4	34,2	0,0	0,0	14,4	0,0
Arith-	8,3	20,1	3,7	4,1	7,5	0,0
metisches						
Mittel						

Abb.2 Mitoseindices (in Promille) Patientin E.L.

Originalausstrich	1,4
Kontrolle 24 Stunden	29,0
Kontrolle 48 Stunden	6,3
Kontrolle 72 Stunden	1,9
10 E/ml L-Asparaginase	19,1
24 Stunden	
10 E/ml L-Asparaginase	0,0
48 Stunden	
10 E/ml L-Asparaginase	-
72 Stunden	
10 E/ml L-Asparaginase +	20,0
TC 199 24 Stunden	
10 E/ml L-Asparaginase +	11,8
TC 199 48 Stunden	
10 E/ml L-Asparaginase +	0,0
TC 199 72 Stunden	

Abb.3 Mitoseindices (in Promille)

Original- ausstrich	Kontrolle			Meerschweinchen- serum(0,1 und 1,0 %)		
	24Std	48Std	72Std	24Std	48Std	72Std
Z.S. 17,4	7,4	0,0	-	5,5	3,2	-
B.W. 12,4	0,0	0,0	0,0	5,7	7,1	0,0
B.W. -	-	-	-	17,0	8,0	3,0
Arith-14,9	3,7	0,0	0,0	9,4	6,1	1,0
metisches						
Mittel						

E r y t h r o p o e s e

Einzelwerte der Summenkurve Abb.1

Mitoseindices (in Promille)

Original- ausstrich	Kontrolle			10 E/ml L-Asparaginase		
	24Std	48Std	72Std	24Std	48Std	72Std
S.E. 11,8	20,8	0,0	0,0	0,0	17,8	0,0
Sch.V.14,2	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0
M.I. 4,9	16,8	26,6	-	4,0	2,4	-
Sch.E.23,1	54,5	0,0	0,0	9,5	0,0	-
E.L. 4,5	18,5	0,0	0,0	0,0	0,0	-
v.S.H.23,7	25,9	15,8	0,0	0,0	5,6	0,0
Arith-13,8	22,7	7,0	0,0	2,4	4,3	0,0
metisches						
Mittel						

Mitoseindices (in Promille)

Abb. 2 Patientin E.L.

Originalausstrich	4,4
Kontrolle 24 Stunden	18,5
Kontrolle 48 Stunden	0,0
Kontrolle 72 Stunden	0,0
10 E/ml L-Asparaginase 24 Stunden	0,0
10 E/ml L-Asparaginase 48 Stunden	0,0
10 E/ml L-Asparaginase 72 Stunden	-
10 E/ml L-Asparaginase + TC 199	0,0
24 Stunden	
10 E/ml L-Asparaginase + TC 199	0,0
48 Stunden	
10 E/ml L-Asparaginase + TC 199	0,0
72 Stunden	

Abb. 3 Mitoseindices (in Promille)

Original- ausstrich	Kontrolle			Meerschweinchen- serum (0,1 u. 1,0 %)		
	24Std	48Std	72Std	24Std	48Std	72Std
Z.S.	15,3	11,8	0,0	-	5,1	0,0
B.W.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B.W.	-	-	-	-	38,4	0,0
Arith	7,6	5,9	0,0	0,0	14,4	0,0
metisches Mittel						

Eine karyologische Kurve, die eine quantitative Darstellung der Mitoseverhältnisse zeigt, konnte nicht angefertigt werden, da mit L-Asparaginase-Zusatz in der roten Reihe nur 15 und in der weißen Reihe nur 22 Mitosen gefunden wurden.

Für die Mitosen der Erythropoese läßt sich mit Hilfe des t - Testes bei Kontroll- und Zusatzkultur eine Signifikanz errechnen.

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\frac{(N_1 - 1) s_1^2 + (N_2 - 1) s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

$$x_1 = 23,9$$

$$x_2 = 2,53$$

$$t = 2,7$$

Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt demnach 5 %.

Für die Granulopoese erübrigt sich die Rechnung nach 48 Stunden, da mit L-Asparaginase keine Mitosen mehr gefunden werden. Nach 24 Stunden ergibt die Rechnung keine Signifikanz.

Das Zahlenverhältnis von Granulocyten zu Erythrocyten, der G/E Index (Tab.C), zeigt in den Sofortausstrichen der Sternalpunktate der drei Versuchsreihen Werte von unterschiedlicher Größe. In den Kontrollen nach 24 Stunden finden sich bei Abb.2 und Abb.3 niedrigere Indices als in den Originalausstrichen, die allerdings nach 48 Stunden wieder ansteigen. Bei den Zusatzkulturen lassen sich beim G/E Index in vitro keine einheitlichen Veränderungen feststellen.

Tabelle C

G/E Indices

Einzelwerte der Summenkurve Abb. 1

Original- ausstrich	Kontrolle			10 E/ml L-Asparaginase			
	24Std	48Std	72Std	24Std	48Std	72Std	
S.E.	2,1	2,8	3,8	4,2	1,3	2,7	1,8
Sch.V.	0,9	1,9	3,0	0,5	0,1	0,8	0,5
M.I.	1,8	1,6	2,8	-	0,9	1,3	-
Sch.E.	2,1	1,7	5,1	3,6	1,2	3,7	-
E.L.	2,9	1,8	2,5	3,2	4,2	2,1	-
v.S.H.	0,6	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2	0,3
Arith- metisches Mittel	1,7	1,7	2,9	2,3	1,3	1,8	0,9

Abb. 2 G/E Indices

Patientin E.L.

Originalausstrich	2,9
Kontrolle 24 Stunden	1,8
Kontrolle 48 Stunden	2,5
Kontrolle 72 Stunden	3,2
10 E/ml L-Asparaginase 24 Stunden	5,6
10 E/ml L-Asparaginase 48 Stunden	2,1
10 E/ml L-Asparaginase 72 Stunden	-
10 E/ml L-Asparaginase + TC 199 24 Stunden	2,5
10 E/ml L-Asparaginase + TC 199 48 Stunden	1,3
10 E/ml L-Asparaginase + TC 199 72 Stunden	7,1

Abb. 3

G/E Indices

Original- ausstrich	Kontrolle			Meerschweinchen- serum (0,1 u.1,0 %)		
	24Std	48Std	72Std	24Std	48Std	72Std
Z.S. 4,1	1,7	1,7	-	1,6	1,3	-
B.W. 4,8	2,0	3,1	2,2	4,3	3,9	6,3
B.W. -	-	-	-	9,0	8,1	3,0
Arith-4,4	1,8	2,4	2,2	5,0	4,1	4,6
metisches Mittel						

D i s k u s s i o n

Untersuchungen über die Einwirkung von L-Asparaginase auf die normale Hämatopoese sind uns nicht bekannt. Die Literatur berichtet nur über die Stoffwechselhemmung leukämischer Zellen durch das Enzym. Nach Grundmann (12) ist die Frage, in wie weit auch normal wachsende Gewebe beeinflußt werden, nicht beantwortet.

In dieser Arbeit wurden neun Fälle von nicht leukämischem Knochenmark untersucht. Morphologisch konnten durch die nach Oettgen optimal hemmende Konzentration von 10 E/ml L-Asparaginase, wie durch die Konzentrationen von (0,1 und 1,0 %) Meerschweinchen L-Asparaginase keine Degenerationserscheinungen an den Zellen festgestellt werden. Lebenduntersuchungen mit der Phasenkontrastoptik nach Boll (8) an Blutkulturuntersuchungen bestätigen dieses Ergebnis bei einer Monoblastenleukämie. Astaldi (2) untersuchte verschiedene Leukämien auf morphologische Veränderungen und berichtet über eine Verminderung der Blasten unter der Enzymtherapie. Im Gegensatz dazu konnte Gebauer (14) unter dem Rasterelektronenmikroskop nach L-Asparaginase Verabreichung stechapfelförmig veränderte Erythrocyten, und vermehrte Oberflächenbuchtung der seltenen Leukocyten erkennen.

Die Proliferation wird nach Boll (7) aus den Reifungskurven und den G/E Indices für die Reifung und aus dem Mitoseindex und den karyologischen Kurven für die Regeneration beurteilt.

Die Reifungskurve der Granulopoese ergibt ohne L-Asparaginase Zusatz folgendes Bild: In den ersten 24 Stunden der Inkubation in vitro überwiegt die Zellteilung der Granuloblasten, so daß sich in allen Fällen mit der Zunahme der Granuloblasten eine Linksverschiebung in der Granulopoese zeigt. (Abb. 1) Boll (7) führt diese Vermehrung der teilungsfähigen Zellen nach 24 Stunden in vitro auf die sehr kurze Lebensdauer der Segmentkernigen zurück, sowie auf eine Regenerationsstimulierung der Granuloblasten durch die Kulturbedingungen. Nach 48 - 72 Stunden kommt es zu einem Überwiegen der Zellausreifung, die sich in einer Abnahme der Promyelocyten und in einer Vermehrung der Segmentkernigen äußert, d. h. die Reifung überwiegt die Regeneration und die ausgereiften Zellen nehmen bei Rückgang der Mitoseindices wieder zu. Dieser zu beobachtende Effekt kommt zustande durch das Fehlen des Nachschubs von Stammzellen und durch die Verhinderung der Ausschwemmung von reifen Granulocyten im geschlossenen System der Kultur.

Betrachtet man die direkte Beeinflussung der Granulopoese durch L-Asparaginase bei nicht leukämischem Knochenmark, so finden wir vorwiegend eine Beeinträchtigung der Regeneration. (Tab. B)

Die Reifungskurve (Abb. 1) zeigt eine signifikante Verminderung der teilungsfähigen Zellen bei gleichzeitiger Verringerung des Mitoseindex. (Tab. B) Die Einzelwerte der Summenkurve Abb. 1 (Tab. A) zeigen wie die der Abb. 2 und 3 bei vier Versuchsreihen nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme der Segmentkernigen.

Durch den Zusatz von Medium TC 199 zur L-Asparaginase ergibt sich eine relative Verminderung der Segmentkernigen (Abb. 2) bei gleichzeitiger Erhöhung des Mitoseindex gegenüber L-Asparaginase allein (Tab. B). Durch den Zusatz von Asparagin im Medium TC 199 wird also die L-Asparaginase Wirkung abgeschwächt.

Mit Meerschweinchen Serumzusatz (Abb. 3) zeigt die Reifungskurve wie die Abb. 2 eine Vermehrung der neutrophilen Granulocyten, d. h. Rechtsverschiebung nach 24 Stunden, die nach 48 und 72 Stunden zunimmt. Weiter ist bei der Meerschweinchen L-Asparaginase die Regeneration nicht beeinträchtigt (leicht erhöhter Mitoseindex). In der Granulopoese finden wir vorwiegend eine Herabsetzung der Mitoseindices. Es ist möglich, daß die Rechtsverschiebung in der Granulopoese durch eine isolierte Degeneration der unreifsten Zellen bedingt ist. Es kamen nämlich die wenigen Mitosen auch bei reiferen Granuloblasten als in den Kontrollen vor.

Betrachten wir nun die Proliferationskinetik der Erythropoese (Abb. 1), so finden wir in den Kontrollkulturen nach 24 Stunden eine sehr schnelle Ausreifung der Erythropoese, die nach 48 und 72 Stunden weiter zunimmt. Durch den Zusatz von 10 E/ml L-Asparaginase ist sowohl nach 24 als auch 48 Stunden die gesamte Proliferation (Zellteilung und Zellreifung) signifikant beeinträchtigt. Die Reifung, die in den Kontrollen deutlich gefördert wird, nimmt ab bei gleichzeitiger Regenerationsverminderung. Auch bei der Patientin E. L. (Abb. 2) mit fast normalem Knochenmark, tritt bei Zusatz von L-Asparaginase eine Reifungshemmung ein.

Beim Zusatz von Medium TC 199 zur L-Asparaginase hingegen ergibt sich eine Reifungsbeschleunigung besonders nach 48 Stunden in Bezug auf den Zusatz von 10 E/ml L-Asparaginase. Durch diesen Zusatz ist die L-Asparaginase Wirkung auf die Reifung und Regeneration abgeschwächt. Boll (8) führt dies auf eine ungenügende Menge Asparaginsäure zurück.

Meerschweinchen L-Asparaginase (Abb. 3) zeigt eine ähnliche Wirkung auf die Proliferation der Erythropoese wie die von Bayer hergestellte L-Asparaginase. Jedoch überwiegt hier die Regeneration die Reifung.

Zusammenfassend finden wir also durch 10 E/ml L-Asparaginase in der Erythropoese eine Beeinträchtigung der Zellteilung und Zellreifung.

In den Kulturen mit L-Asparaginase sind die Mitoseindices sowohl der Granulopoese als auch der Erythropoese gegenüber den Kontrollkulturen besonders nach 24 Stunden signifikant herabgesetzt und nach 48 Stunden werden keine Mitosen mehr gefunden. Die Verminderung des Mitoseindex erweist sich somit als zeitlich abhängig vom L-Asparaginase Zusatz. Die durchschnittliche Mitosedauer beträgt - von Boll (6) aus der Erfahrung bei Lebendbeobachtungen angegeben - 1,3 Stunden.

Da sich nach L-Asparaginase-Zusatz weder in der prozentualen Verteilung der einzelnen Mitosephasen noch im morphologischen Bild wesentliche Änderungen gegenüber den Kontrollen feststellen lassen, ist eine Veränderung des Mitoseablaufs und der Mitosedauer wenig wahrscheinlich.

Ob die Proliferationshemmung des normalen Knochenmarks in vitro durch L-Asparaginase ein Korrelat in vivo hat, muß vorerst dahingestellt bleiben, da vergleichende Untersuchungen nicht vorliegen. Es sollte jedoch bei der Tumorbehandlung auch die mögliche Beeinträchtigung der normalen Hämatopoese berücksichtigt werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Da durch L-Asparaginase vorwiegend die Proliferation leukämischer Zellen gehemmt werden soll, wurde geprüft, ob auch die normale Hämatopoese durch dieses Enzym direkt hemmbar ist.

Für unsere Versuchsreihen wurden bei sechs Patienten eine L-Asparaginase aus E.coli verwendet.

Reifungskurven wurden vom Originalausstrich und von den Koagulumkulturen nach 24 - 72 Stunden aufgestellt, sowie der Mitose- und G/E Index bestimmt.

Die Auswertung ergab eine Beeinträchtigung der gesamten Proliferation in der Erythropoese und eine Verminderung der Regeneration in der Granulopoese, während die Reifung in der Granulopoese weniger beeinträchtigt war.

Um die Wirkung von Nebenprodukten wie Glutaminase aus der E.coli Asparaginase auszuschließen, führten wir drei weitere Versuche mit Meerschweinchenserum L-Asparaginase durch, die prinzipiell entsprechende Ergebnisse zeigten.

Bei einer Patientin wurde zur L-Asparaginase statt Hank-Lösung das Asparagin und Glutamin enthaltende Medium TC 199 zugeführt, wodurch die L-Asparaginase Wirkung auf die Reifung abgeschwächt wurde.

Morphologisch konnten durch L-Asparaginase-Zusatz keine eindeutigen Veränderungen an den Zellen festgestellt werden.

L i t e r a t u r a n g a b e n

1. ADAMSON, R.H., Embryotoxic effect of
FABRO, S. L-Asparaginase.
Nature (Lond) 218, 1164
 (1968)

2. ASTALDI, G., Osservazioni Preliminari
BURGIO, G.R., sul Trattamento Della Leu-
SEVERI, F., cemìa Linfocitica Acuta
GENOVA, R. Del Bambino con L-Aspara-
CURTONI, E., ginasi.
BRUSCHELLI, M., Haemat.Lat.XI, 4, 332 (1968)
ASTALDI, A.A., JR.

3. BAUER, K. Zur Biochemie der Aspara-
 ginase.
Med. Klin. 64, 1:9 (1969)

4. BROOME, J.D. Studies on the mechanism of
 tumor inhibition by L-Aspara-
 ginase.
Proc.XII.Int. Congress of
Hematology
New York, 6, (1968)

5. BEGEMANN, H. Ergebnisse der L-Asparaginase
 bei akuten Leukämien.
Intern.Arb.Tagg. über Chemo-
und Immuntherapie der Leu-
kosen und malignen Lymphome.
Wien, 1969
Dt. Med. Z. 17 (1969)

6. BOLL.I. Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro.
I. Granuloblastenmitosen
Fol.haemat.,N.F., 3 (1958)
7. BOLL.I. Granulocytopoese unter physiolog. und patholog. Bedingungen.
Berlin-Heidelberg-New York
Springer 1966
8. BOLL.I. und
U.RECKERS Die Beeinflussung der Proliferationskinetik normalen menschlichen Knochenmarks in vitro durch L-Asparaginase.
Int.Arb.Tagg. über Chemo- und Immuntherapie der Leukosen und malignen Lymphome.
Wien, 41 (1969)
9. BURCHENAL,J.H.,
KARNOFSKY,D.A.,
MURPHY,D.L.,
OETTGEN,H.F. Effects of L-Asparaginase on leucemias and other neoplasms.
Proc.XII.Int.Congress of Hematology
New York (1968)
10. CLINE,M.J. Prediction of in vitro cytotoxicity of chemotherapeutic agents by their effect on malignant leucocytes in vitro.
Blood, 30,176 (1969)

17. OETTGEN, H.F., SCHULTEN, H.K. Hemmung maligner Neoplasien des Menschen durch L-Asparaginase.
Klin.Wschr. 47, 2:65 (1969)
18. OETTGEN, H.F. Akute Leukämien reagieren auf L-Asparaginase.
Medical Tribune 2, 15 (1968)
19. OETTGEN, H.F., OLD, L.J., BOYSE, E.A., CAMPBELL, H.A., PHILIPS, F.S., CLARKSON, B.D., TALAL, L., LEEPER, R.D., SCHWARTZ, M.K., KIM, J.H. Inhibition of leucemias in man by L-Asparaginase.
Canc.Res. 27, 2619 (1967)
20. ROHR, K. Das menschliche Knochenmark.
Stuttgart (1960)
Georg Thieme
21. SENN, H.J. Die Behandlung akuter Leukämien mit L-Asparaginase.
Praxis 58, 21:669 (1969)
22. SCHMIDT, C.G. und GALLMEIER, W.M. Neuere Entwicklungen in der Chemotherapie: Die Enzymtherapie der Leukämien.
Dtsch.Krebskongress, Berlin, 4 (1968)

23. SCHMIDT, C.G. und GALLMEIER, W.M. Zur Enzymtherapie der Leukämien.
Dtsch.Med.Wschr. 93:2299
(1968)
24. SCHMIDT, C.G. Therapie der Hämoblastosen mit L-Asparaginase.
DÄ 1:9 (1969)
25. SOBIN, L.H., KIDD, J.G. A metabolic difference between two lines of lymphoma 6 C₃HED cells in relation to asparagin.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 119:325 (1965)
26. STIER, L.H., GALLMEIER, W.M., SCHMIDT, C.G. Über Störungen des Blutgerinnungssystems im Verlauf der Enzymtherapie maligner Tumoren und Hämoblastosen.
Dtsch.Med.Wschr. 94,253
(1969)
27. STÖCKL, W., STACHER, A., WEISER, M. und HÖCKER, P. Die Beeinflussung der freien Aminosäuren von Patienten mit akuten Leukosen durch L-Asparaginase.
Intern.Arb.Tagg. über Chemo- und Immuntherapie der Leukosen und malignen Lymphome.
Wien, 35 (1969)
28. Wissenschaftliche Tabellen
J.R. Geigy, Basel

Frau Prof.Dr. med.I.Boll danke ich für die Überlassung des Themas und Ihre freundliche und fachkundige Unterstützung.

Herrn Prof.Dr.med. und Dr.rer.nat.G.Fuchs danke ich für die Unterweisung und Durchführung der Signifikanzberechnung.

Ebenfalls gilt mein Dank dem ärztlichen Direktor des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln, Herrn Prof.Dr.med.K.Holldack.

L e b e n s l a u f

Als Tochter des Zahnarztes Dr. Hans Reckers und seiner Ehefrau Lore, geb. Lewe wurde ich am 15. Februar 1943 in Lönningen (Oldb.) geboren.

Nach dem 2. Weltkrieg eröffnete mein Vater eine Zahnarztpraxis in Salzbergen. Dort besuchte ich fünf Jahre die Volksschule.

1963 bestand ich an der Liebfrauenschule zu Meppen die Reifeprüfung.

Seit dem Sommersemester 1963 studierte ich an der Eberhard - Karls - Universität Tübingen Zahnmedizin, wo ich im Herbst 1965 das Physikum bestand. Die klinischen Semester absolvierte ich an der Albert - Ludwigs - Universität in Freiburg. Hier beendete ich im Juli 1968 das zahnmedizinische Studium mit dem Staatsexamen. Im Herbst 1969 trat ich eine Assistentenstelle bei einem Zahnarzt in Berlin an.

